人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

ReproCELL

ReproCELL

霊長類(ヒト&サル)ES細胞用

凍結保存液

取扱説明書

Cat.#. RCHEFM001: 25 mL

保存方法

本品は-20℃で発送されますが、外観は粘性の高い液体です。到着後-80℃で保存して下さい。使用時は 2~8℃で保存し、2 週間を目安に使い切って下さい。凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

- 高い生存率での凍結保存が可能になります
- 凍結解凍後の生存率が良好で、通常 3~4 日後には継代が可能です。
- 凍結細胞は、-135℃以下のフリーザーで長期保存が可能です。
- 細胞は液体窒素で急速凍結させるため、プログラムフリーザーが不要です。
- カニクイザル ES 細胞で検査済みです。
- 浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
- 希釈せずに使用できますので、試薬調整の手間が省けます。
- 血清は不含です※。

※ 動物由来のタンパクを含みます。
DMSO および Propylene glycol を含みます。

製品について

本品は研究用ですので、治療診断目的には使用しないでください。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

使用方法

霊長類 ES 細胞用凍結保存液をご使用されるにあたり、以下の使用方法を十分にお読み下さい。

・凍結方法

凍結を始める前に

高い生存率を得るためには、細胞を凍結保存液に懸濁後、液体窒素により急速凍結させることが重要です。凍結保存液への懸濁から凍結までに長時間要すると細胞生存率が極端に低下する原因になります。操作をスムーズに進めるために、完全に準備が整っていることを確認してから開始して下さい。貴重なサンプルを凍結解凍される場合は、操作に十分慣れてから行われることをおすすめします。

必要なもの

・本品:霊長類 ES 細胞用細胞凍結保存液(使用前に解凍し、氷中で冷やしておきます。)
・霊長類 ES 細胞用培地(使用前に室温にもとします。)
・霊長類 ES 細胞用細胞剥離液(使用前に室温にもとします。)
・コンフルエント状態の霊長類 ES 細胞
35 mm から 100 mm ディッシュサイズの場合、各 1 枚から凍結チューブ各 1 本へ凍結可能です。
・PBS (-): Ca^{++},Mg^{++}-free PBS
・15 ml 遠心チューブ
・液体窒素
・氷
・ピンセット(液体窒素につけても大丈夫なものをご用意下さい。)
・p-1000 ピペットマンおよび滅菌済みチップ
・1 ml 凍結チューブ
・凍結チューブ用たて
・その他培養操作に通常必要なもの

操作方法

(以下の試薬用量は、60 mm ディッシュ 1 枚の場合です。)
1、必要なものを準備します。
・凍結チューブをあらかじめ氷上で冷やします。このとき、チューブのラベルに必要事項(例 細胞名、継代数、日付等)を記入しておきます。
・液体窒素をクリーンベンチの側に置きます。**細胞を凍結液に懸濁後、液体窒素中で凍結が完了するまでの時間が、凍結解凍後の細胞生存率へ大きく影響してきます。そのため、液体窒素中へ細胞をつけるまでの時間を短くする(15 秒以内)ことが重要です。**
・クリーンベンチ内を準備します。15ml 遠心チューブ、凍結チューブたて、ピンセット、p-1000 ピペットマンおよび滅菌済みチップを使いやすい所に配置します。P-1000 ピペットマンをあらかじめ 200μ L にセットしておきます。
2、コンフルエント状態の ES 細胞を準備します。
3、培地を除き、PBS(-) 2~3 mL で 1 回細胞を洗います。
4、あらかじめ室温にもどした霊長類 ES 細胞用細胞剥離液をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃、CO_2 インキュベーターで 5 分程加温します。
5、霊長類 ES 細胞用培地を 2~3 ml 加え、コロニーを塊のまま剥がします。この時、凍結解凍の作業過程で、コロニーは自然にほぐれるため、ここでコロニーをくずす必要はありません。
6、細胞懸濁液を 15 mL 遠心チューブに回収します。ディッシュに細胞が残っているようなら、もう一度新しい培地を加えて残りの細胞を回収します。
7、約 170×g(1,000 rpm)、4℃、5 分間遠心します。
8、サンプルが数本ある場合は、遠心後氷冷しておきます。

All rights reserved - ReproCELL Inc. 2005

以下の操作は、1 サンプルずつ行うようにして下さい。

9、上清をできるだけ取り除きます。**注1）**
10、あらかじめ氷冷しておいた凍結チューブ 1 本をクリーンベンチ内に用意します。
11、p-1000 ピペットマンで凍結保存液を 200μ L はかりとります。**注2）**
12、細胞を凍結保存液に懸濁後、凍結チューブへ移します。すばやく蓋を閉めてピンセットで凍結チューブを保持し、チューブの底部から 2/3 までを液体窒素にひたします。**注3）**
（**この操作を手早く行う事が凍結保存を成功させるために非常に重要です。15 秒以内を目安に作業を完了させて下さい。**）
13、液体窒素中で十分に冷却し、内部まで完全に凍結します。その後、液体窒素タンクもしくは-135℃以下のフリーザーに移します。

・解凍方法

解凍を始める前に

あらかじめ十分にあたためた培地で細胞を懸濁することで急速に解凍を行います。この操作に時間をかけると生存率低下の原因になります。1 回の操作で凍結チューブ 1 本ずつ行うようにして下さい。**ウォーターバスでの解凍は細胞生存率を極端に低下させる原因になりますので、絶対に行わないで下さい。**

必要なもの

・凍結されたヒト/サルES細胞
・霊長類 ES 細胞用培地（あらかじめ必要量を 37℃ウォーターバスで温めておきます。）
・15 ml 遠心チューブ
・フィーダー細胞の準備されたディッシュ（ディッシュのサイズは、凍結時のディッシュサイズと同じものをご用意下さい。）
・液体窒素もしくはドライアイス
・その他培養操作に通常必要なもの

操作方法

1、あらかじめ、15 mL 遠心チューブに培地を 10 mL 加え、37℃ウォーターバスで温めておきます。
2、温めた培地をクリーンベンチ内に準備します。凍結細胞を液体窒素もしくはフリーザーから出し、液体窒素もしくはドライアイスで保存しながらクリーンベンチまで運びます。
3、**すぐに 37℃に温めた培地を 800μ L 加え、2～3 回ピペッティングを行うことで急速解凍します。（この操作が解凍を成功させるのに非常に重要です。）**
4、細胞懸濁液を遠心チューブに移します。
5、約 170×g（1,000 rpm）、4℃、5 分間遠心します。
6、上清を除き、新しい培地 4 mL を加え懸濁します。
7、フィーダー細胞が準備されたディッシュに細胞懸濁液を移し、37℃ CO_2 インキュベーターで培養を開始します。翌日から毎日培地交換して下さい。通常 3～4 日後には継代可能な状態になります。

ご注意）

1）上清が残っていると凍結保存液が希釈されるため、凍結解凍後の細胞生存率低下の原因になることがあります。
2）凍結する細胞数にかかわらず、凍結保存液は凍結チューブ 1 本あたり 200μ L で凍結可能です。
3）細胞を凍結液に懸濁する際は、2～3 回のピペッティングで充分です。それ以上の操作は生存率低下の原因になります。

関連商品

・霊長類 ES 細胞用培地（500 mL　Cat. No.RCHEMD001）
・霊長類 ES 細胞用培地（250 mL　Cat. No.RCHEMD002）
・霊長類 ES 細胞用細胞剥離液（30 mL　Cat. No.RCHETP002）

販売元　（株）リプロセル
東京都港区白金台 3-16-13
白金台ウスイビル 7F
www.reprocell.com

製造元　コージンバイオ（株）
埼玉県坂戸市千代田 5 丁目 1 番地 3

All rights reserved - ReproCELL Inc. 2005